

Identifisering av et protein som kan være involvert i glutamattransport

av

Tahir R. Ahmad

Kull H-99



Januar 2005

Studentoppgave i medisin
Institutt for medisinske basalfag
&
Institutt for molekylær mikrobiologi
Universitetet i Oslo

Innhold

1. Introduksjon	3
1.1 Hensikten med oppgaven	3
1.2 Glutamat i sentralnervesystemet	4
1.3 Glutamat som signalstoff	4
1.4 Glutamatreseptorer	4
1.5 Glutamattranportører	5
1.5.1 Høyaffinitetsglutamattransportører	5
1.5.2 Glutamattransportørenes lokalisering	5
1.5.3 Glutamattransportørenes molekulære struktur	6
1.6 Glutamatopptak og støkiometri	7
1.7 Intracellulære glutamattransportører	8
1.8 Glutamatmetabolisme	8
1.9 Regulering av glutamatopptak	10
 2. Resultater	 11
2.1 Affinitetsrensing av p83 med GLT	11
2.2 Sekvensering av p83	11
2.3 Sekvensscreening av p83 i cDNA-database	12
2.4 Subkloningsreaksjoner	12
2.5 Proteinekspresjonsanalyser	13
 3. Diskusjon/ konklusjon	 16
 4. Materiale og utstyr	 17
4.1 1% Agarosegeler	17
4.2 12 % Polyakrylamidgeler (SDS-PAGE)	17
4.3 Dobbleltdestillert vann (ddH ₂ O)	17
4.4 Sekvensering	17
4.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)	17
4.6 Restriksjonskutting og ligeringsreaksjoner	18
4.7 Transformering ved elektroporering	18
4.8 Isolering av plasmid-DNA (Mini prep)	18
4.9 Proteinekspresjonsanalyse	19
4.10 Coomassiefarging	19
4.11 Western Blot	20
4.12 TNT® Quick Coupled Transcription/ Translation System	20
 Referanser	 21

1. Introduksjon

1.1 Hensikten med oppgaven

Glutamat er den viktigste eksitatoriske nevrotransmitteren i sentralnervesystemet (Fonnum et al., 1984) og blir fjernet fra synapsespalten og det ekstracellulære rom ved hjelp av natriumavhengige glutamatttransportører (EAAT1-5) (Danbolt et al., 2001). Samtidig som hjernen inneholder store mengder glutamat intracellulært, er hjernen meget følsom for høye ekstracellulære glutamatkonsentrasjoner noe som impliserer at det må finnes gode og effektive mekanismer for å fjerne glutamat fra det ekstracellulære rom. Det har tidligere blitt vist at en annen type glutamatttransportør (EAAT4) som i hovedsak finnes i cerebellum, har to interagerende proteiner (GTRAP41, GTRAP48) som forankrer og/eller modulerer virksomheten til denne glutamatttransportøren (Jackson et al., 2001). Jeg har ønsket å forstå glutamats rolle i signalformidling i sentralnervesystemet og spesielt glutamatttransportørens virkningsmekanisme. I tillegg til å gå i dybden i den rådende litteraturen har jeg klonet og kartlagt et mulig forankringsprotein til GLT ved hjelp av en rekke grunnleggende biokjemiske og molekylærmikrobiologiske metoder.

1.2 Glutamat i sentralnervesystemet

Aminosyren L-glutamat inngår i mange metabolske prosesser i hjernen. Glutamat deltar i signalformidling og er den viktigste eksitatoriske nevrotransmitteren i sentralnervesystemet. Den er involvert i de aller fleste fysiologiske og patologiske hjernefunksjoner deriblant kognitive funksjoner, hukommelse og læring. Glutamat spiller en sentral rolle i sentralnervesystemets utvikling, særlig i synapseutvikling, cellemigrasjon, differensiering og celledød. De fleste nevroner og gliaceller har glutamatreseptorer i cellemembranen. Glutamat virker også som signalmolekyl i andre perifere organer som tarm, hjerte, pankreas og placenta.

Hjernevev inneholder store mengder glutamat (ca. 5-15 mmol/kg hjernemasse avhengig av lokalisasjon i hjernen). Til tross for dette er det svært lite av dette glutamatet som befinner seg i det ekstracellulære rom. Man regner med at glutamatkonsentrasjonen i ekstracellulærvæsken og cerebrospinalvæsken (CSF) er henholdsvis ca. 3-4 μM og 10 μM (Hamberger et al., 1983; Lehman et al., 1983; Hamberger og Nyström, 1984). Dette betyr en konsentrasjonsforskjell på over 1000 ganger fra det intracellulære til det ekstracellulære rom. Den høyeste konsentrasjonen av glutamat finner man i nerveterminalen i synaptiske vesikler. (Ottersen et al., 1992). Glutamat frigjøres konstant fra nerveterminalen ved depolarisering og virker på spesifikke glutamatreseptorer som er oppkonsentrert i cellene i nærheten av nerveterminalen. Ved sviktende energitilførsel til cellene vil glutamat frigjøres uhemmet til det ekstracellulære rom. Overstimulering av glutamatreseptorer er skadelig, og glutamat i høye konsentrasjoner ekstracellulært er nevrotoksisk. Derfor må glutamat bli fjernet fra all ekstracellulærvæske ettersom det finnes glutamatreseptorer (se eget avsnitt) på de aller fleste cellulære elementer (dendritter, nerveterminaler, nevronlegemer og gliaceller). Ekstracellulære enzymer som metaboliserer glutamat er ikke påvist. Enkel diffusjon kan også være en viktig mekanisme for å fjerne ekstracellulær glutamat fra synapsespalten. Det er likevel påvist at cellulært opptak av glutamat er den raskeste og mest effektive måten å fjerne glutamat fra ekstracellulærvæsken (Balcar og Johnsen, 1972). Dessuten bidrar dette til å konservere glutamat.

1.3 Glutamat som signalstoff

For å forstå hvordan glutamat inngår i signalformidling, er det viktig å ha et godt inntrykk av den komplekse hjernevevsstrukturen. Grå substans inneholder mange nervekomponenter med høy tetthet av synapser: det spesialiserte område hvor signalformidling foregår og som består av en nerveterminal, synaptisk spalte og en dendritt eller spina. Komposisjonen av hjernevevet er meget kompakt. Den gjennomsnittlige avstand mellom to synapser (i stratum radiatum og gyrus dentatus av hippocampus) er estimert å være ca. 0.5 μm (Rusakov et al., 1998, 1999; Ventura og Harris, 2000). Det er følgelig viktig å forstå hvordan glutamat frigjøres og diffunderer til omliggende strukturer og også virker på glutamatreseptorer (AMPA, NMDA, se nedenfor) og hvordan det til slutt interagerer med glutamtransportøren. Effekten av glutamat er også knyttet til konsentrasjonen glutamat oppnår i de enkelte områder ved frigjøring og hvor fort konsentrasjonen endrer seg. Dette avgjør også hvorvidt glutamat frigjort fra en nerveterminal fører til aktivering av glutamatreseptorer i en nærliggende synapse, også kjent som "intersynaptic cross talk". Glutamatreseptorene er også innbyrdes forskjellige med tanke på affinitet og hvor lenge de er aktivert, mens glutamtransportører består av mange subtyper som er forskjellige med tanke på affinitet og transporteffektivitet.

Det er fortsatt mye som er uklart og det er mange ubesvarte spørsmål om hvordan glutamattansmisjon foregår. Det er f.eks ikke kjent hvor mange glutatmolekyler som frigis fra synapsene, hvor og hvordan de frigis og absoluttallet på glutamatbindende molekyler, dvs. molekyler/ μm^2 . Samtidig er det viktig å huske at de fleste cellulære strukturer kan moduleres og dermed regulere opptak. Både dendrittprosesser (Fifkova, 1985; Fischer et al., 1998) og astrocyttprosesser (Wenzel et al., 1991) kan forandre form ved kontraksjon og distensjon. Formen av dendrittprosessene er delvis regulert av glutamatreseptorene (Korkotian og Segal, 1999). Astrocytter kan også utvide sine prosesser mot aktive synapser (Ventura og Harris, 1999). Alle disse endringene er med på å påvirke glutatdiffusjon og reseptoraktiveringsmønsteret.

1.4 Glutamatreseptorer

Tre forskjellige familier av glutamatreseptorer er identifisert ved kloning (Hollmann og Heinemann, 1994). En av familiene aktiveres av en glutamat analog, N-metyl-D-aspartat (NMDA), og disse reseptorene (NR1, NR2A, NR2B, NR2C og NR2D) blir kollektivt kalt NMDA-reseptorer. En annen familie glutamatreseptorer aktiveres av α -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazol propionsyre (AMPA). AMPA og NMDA reseptorene er glutamatstyrte ionekanaler (leder kun Na^+ , eller Na^+ og Ca^{2+} , henholdsvis) og kalles kollektivt ionotrope glutamatreseptorer. AMPA-reseptorene åpner raskt ved glutamataktivering, men desensibiliseres også raskt, samtidig som de har lav affinitet for glutamat. I motsetning til dette har NMDA-reseptorene mye høyere affinitet men aktiveres saktere. NMDA-reseptor-aktivering krever depolarisering av cellemembranen forut for glutamataktivering.

Den tredje familien av glutamatreseptorer består av G-proteinkoblede reseptorer, også kjent som de metabotrope reseptorene (mGluR1-8) som er videre inndelt i gruppe I-III. Gruppe I reseptorer er koblet til fosfolipase C og fører dermed til økt inositoltrifosfat og diacylglyserol produksjon. Gruppe II og III reseptorene er motsatt koblet til adenylat cyklase.

En fjerde type glutamareseptorer, den såkalte delta (-glutamat) reseptoren er omdiskutert. Disse proteinene viser sekvenshomologi med de ionotrope glutamatreseptorene og antas dermed å være reseptorproteiner. Man har ikke klart å kartlegge deres funksjon ennå, eller funnet analoger som kan stimulere disse proteinene.

1.5 Glutamattransportører

Hjernecellene uttrykker flere proteiner som kan transportere glutamat over cellemembranen. Noen av disse uttrykkes i plasmamembranen mens andre finnes intracellulært. Glutamattransportørene i plasmamembranen inndeles i *høyaffinitets glutamattransportører* og *lavaffinitets glutamattransportører*. Jeg vil kun snakke om høyaffinitetstransportørene ettersom deres funksjon og utbredelse er best kjent, og relevant til mitt forskningsarbeid og kort nevne de intracellulære glutamattransportørene tilslutt. (for oversikt se *N.C Danbolt, Progr I Neurobiolo 2001*).

1.5.1 Høyaffinitets glutamattransportører

Man har hittil klonet fem subtyper av glutamattransportører med høy affinitet (dvs $K_m < 100 \mu M$). Disse har innbyrdes relativt stor primærsekvenshomologi, ca. 50-60% innen samme dyreart. Felles for alle transportørene i denne gruppen er at de drives av Na^+ og K^+ -gradienter og blir dermed ofte kalt "natrium og kalium-koplede glutamattransportører", eller eksitatoriske aminosyretransportører (EAAT1-5). De fem klonede transportørene er GLAST (EAAT1) (Storck et al., 1992; Tanaka, 1993), GLT (EAAT2) (Pines et al., 1992), EAAC (EAAT3) (Kanai og Hediger, 1992), EAAT4 (Fairman et al., 1995) og EAAT5 (Arriza et al., 1997). K_m til glutamattransportørene er fra 2-100 μM avhengig av subtype. Alle disse transportørene gjenkjenner i tillegg aspartat.

1.5.2 Glutamattransportørenes lokalisasjon

På bakgrunn av DNA-sekvens er det utviklet spesifikke antistoffer og DNA/RNA-prober som har gjort det mulig å bestemme lokalisasjonen til transportørene. De fem glutamattransportørene viser differensiert lokalisasjon i sentralnervesystemet.

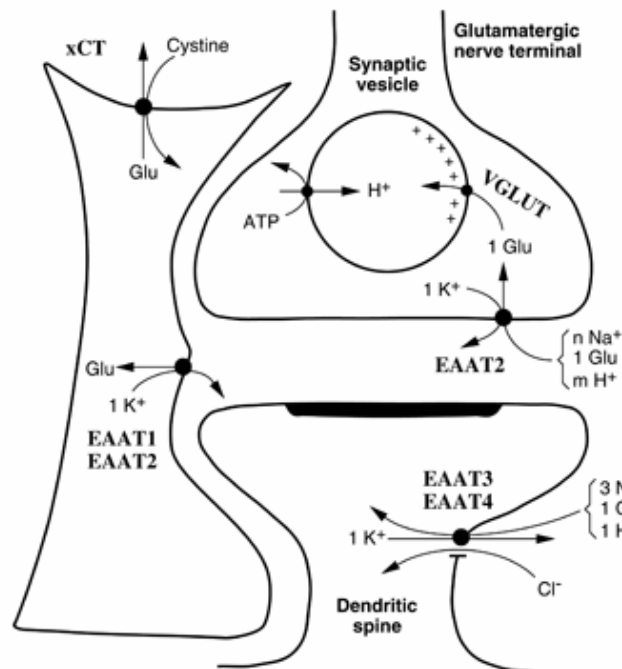
GLT (EAAT2) er den kvantitativt mest dominerende glutamattransportøren i forhjern, GLT finnes fortrinnsvis i hippocampus, laterale septum, cerebrale cortex og i striatum (Lehre et al., 1995). Høyest konsentrasjon av GLT finnes i hippocampus (stratum radiatum, CA1), der konsentrasjonene er anslått å være ca. 12.000 molekyler pr. μm^3 (Lehre og Danbolt, 1998). GLT-proteinet er kun funnet uttrykt på gliaceller, mens man har GLT mRNA også tilstede i enkelte nevroner.

GLAST (EAAT1) er uttrykt i hele sentralnervesystemet, men konsentrasjoner varierer i de forskjellige regioner (Lehre et al., 1995; Schmitt et al., 1997; Berger and Hediger, 1998). GLAST finnes også i noen perifere organer og vev. GLAST er den dominerende transportøren i cerebellum (Chaudhry, 1995), men proteinet finnes også uttrykt på astroglia i andre deler av sentralnervesystemet, deriblant retina.

EAAC (EAAT3) finnes i flere organer, deriblant hjernen. Man har funnet størst konsentrasjon av denne transportøren i hippocampus, cerebellum og i basalgangliene (Conti et al., 1998; Kugler and Schmitt, 1999). I motsetning til GLT og GLAST (Chaudhry et al., 1995), og EAAT4 (Dehnes et al., 1998) som alle er uttrykt på plasmamembraner, finnes EAAC hovedsaklig i cytoplasma under fysiologiske forhold (Conti et al., 1998; Kugler og Schmitt, 1999). Man antar at EAAC raskt kan mobiliseres til plasmamembranen ved behov.

EAAT4 uttrykkes i hovedsak i cerebellums purkinjeceller og er påvist hos voksne rotter (Yamada et al., 1996; Nagao et al., 1997; Tanaka et al., 1997; Dehnes et al., 1998) og i menneske (Bar-Peled et al., 1997; Furuta et al., 1997; Itoh et al., 1997; Inage et al., 1998). EAAT4 uttrykkes i høyest konsentrasjon i spinamembranen der den er i kontakt med gliaceller (Dehnes et al., 1998).

Det er ingen publisert data om lokalisering av EAAT5 enda, dog er det vist sterkt signal fra retina ved Northern blotting, men ikke fra hjernen (Arriza et al., 1997).

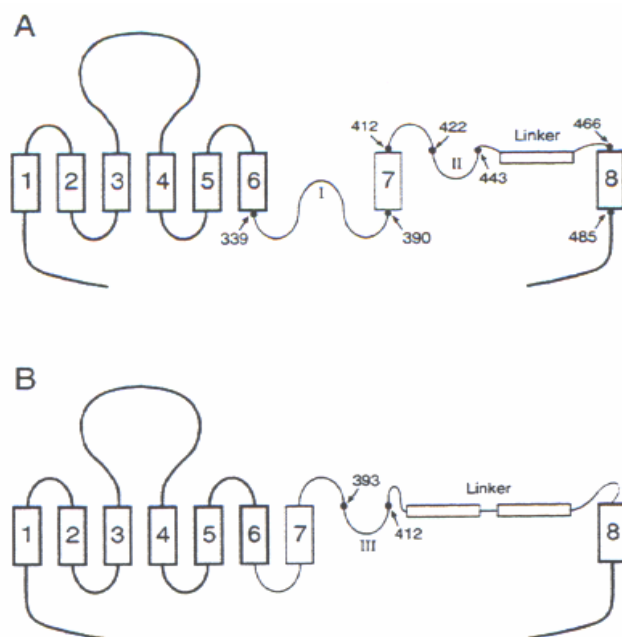


Lokaliseringen av de ulike glutamattransportørene. Figur: Danbolt, N.C, Progress in Neurobiology 2001.

1.5.3 Glutamattransportørenes molekulære struktur

Glutamattransportørene er sannsynligvis homooligomerer, dvs. bestående av 2-3 like enheter. Når ferskt hjernevev fra rotte homogeniseres og løses opp i SDS (sterkt løsemiddel) og proteinene umiddelbart blir separert ved hjelp av SDS-polyakrylamidelektroforese i fravær av reduserende agens, ser man kun glutamatmonomerer på blot (Danbolt et al., 1992). I motsetning til dette ser vi oligomerbånd på blot når hjernevevet behandles med en kryssbinder (Haugeto et al., 1996; Dehnes et al., 1998). De ulike transportørene danner imidlertid ikke oligomerkomplekser med hverandre, noe som impliserer at de må være homooligomerer, til tross for at man finner to av transportørene (GLAST og GLT) intermitterende i gliamembraner (Haugeto et al., 1996). Tilsvarende oligomerstruktur er også rapportert for EAAC som har vist seg å være en pentamer (Eskandari et al., 2000).

Topologien til glutamatttransportørene er fremdeles usikker, og det er foreslått forskjellige modeller med henholdsvis 10, 8 og 6 transmembrandomener (TM) for EAAT1-3 (Kanai og Hediger, 1992; Pines et al., 1992; Storck et al., 1992). Man antar at antall TM er lik for alle transportører siden den primære proteinstrukturen er veldig lik. Fire grupper (Slotboom et al., 1996; Wahle og Stoffel, 1996; Grunewald et al., 1998; Seal og Amara, 1998) har forsøkt å demonstrere topologien nærmere, men alle har kommet til ulike resultater. Det er dog enighet om de 6 første TM, som man tror er α -helikser, og at både N- og C-terminalen til transportørene er intracellulære.



Den antatte topologien til glutamatttransportørene GLT (A) (Grunewald og Kanner, 2000) og GLAST (Seal et al., 2000). Det er enighet om de første 6 transmembrane segmentene, mens det fremdeles er debatt om de resterende segmenter. Figur: Danbolt, N.C, Progress in Neurobiology 2001.

1.6 Glutamatopptak og støkiometri

Glutamatopptaket er avhengig av de elektrokjemiske gradienter for Na^+ og K^+ over cellemembranen. Natrium er nødvendig for at glutamat skal binde seg og for translokasjonen, mens kalium er nødvendig for tilbakevending av proteinet (Kanner og Sharon, 1978; Roskoski 1979; Barbour et al., 1988; Attwell et al., 1991; Szatkowski et al., 1991). Netto transport av glutamat inn i cellen vil derfor kun være mulig hvis det finnes kalium intracellulært (Danbolt et al., 1994). Selve prosessen er elektrogen, dvs. at vi har netto positiv ladning som går inn, og stimuleres derfor av et negativt membranpotensiale. Dette betyr igjen at det genereres målbar strøm som kan anvendes i elektrofysiologiske studier.

Den nøyaktige støkiometrien, dvs. antall ioner av Na^+ og K^+ som bindes for hvert molekyl glutamat, har vært gjenstand for diskusjon ettersom det både er en vanskelig og viktig parameter å måle. Energiforbruket ved transport, transportørens konsentrative kapasitet og transportprosessens sensitivitet til forandringer i ionekonsentrasjonen (f.eks under iskemi) er alle avhengig av støkiometrien. Studier av rotte-GLT (Levy et al., 1998) viser at både EAAC og GLT- transportørene har følgende støkiometri: én glutamat tas opp sammen med tre Na^+

og én H^+ i bytte for én K^+ . Denne koblingen støtter en transmembran glutamatkonsentrasjon ($[Glu]_{inne}/[Glu]_{ute}$) i overkant av 10^6 ved likevekt, og tillater transportørene å fjerne glutamat i et bredt spekter av metabolske tilstander. Basert på støkiometrien ovenfor har det blitt estimert at energiforbruket til glutamattransportørene i cerebral cortex representerer ca. 2% av det totale vevs energikonsum (Attwell og Laughlin, 2000).

1.7 Intracellulære glutamattransportører

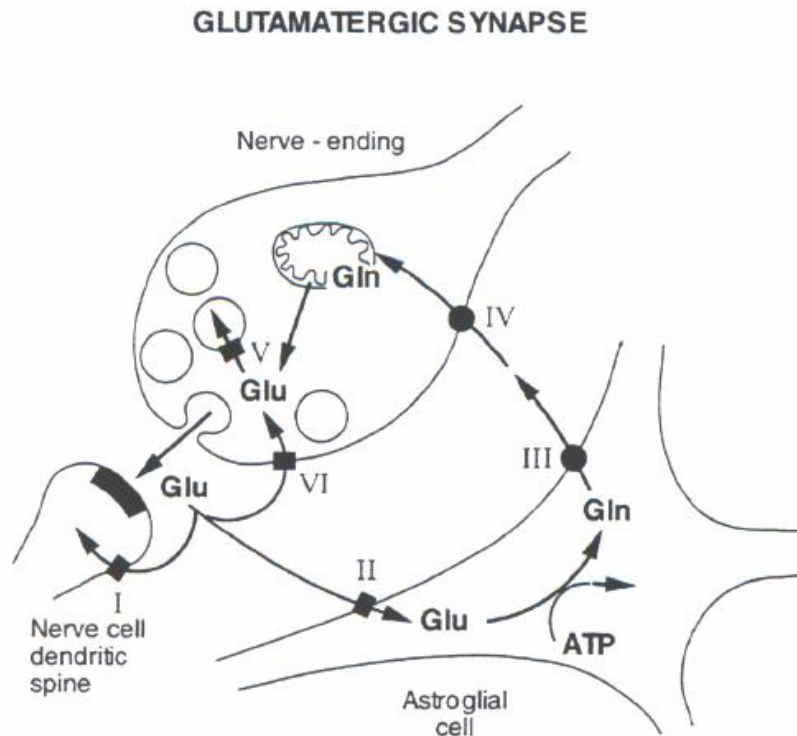
Transportørene beskrevet ovenfor er funksjonelle på plasmamembranen. Det finnes også intracellulære glutamattransportører, og disse er lokalisert til mitokondrier (Palmieri et al., 2001) og i synaptiske vesikler (Özkan og Ueda, 1998). Det er kartlagt to forskjellige mekanismer for glutamatopptak i mitokondriene. Den første transportøren er en proton-glutamat symport, mens den andre er en glutamat-aspartat antiport (Dennis et al., 1976; Minn og Gayet, 1977; Kramer og Heberger, 1986; Kramer og Palmieri, 1989).

I glutamaterge nerveterminaler blir glutamat akkumulert i synaptiske vesikler for å bli brukt som nevrotransmitter. Glutamattransportøren som flytter glutamat inn i vesiklene viser også svært liten likhet med transportørene i plasmamembranen. I motsetning til plasmamembrantransportørene er den vesikulære transportøren uavhengig av både natrium og kalium, har lavere affinitet (K_m rundt 1 mM), er svært selektiv for L-glutamat og stimuleres av lave kloridkonsentrasjoner (Disbrow et al., 1982; Naito og Ueda, 1983; Fykse et al., 1992). Det vesikulære opptaket er drevet av det interne positive membranpotensialet som er generert av en H^+ -ATPase. Denne ATPasen er lokalisert i vesikkelmembranen og pumper H^+ inn i vesiklene. Tre vesikulære glutamattransportører er nå lokalisert: VGLUT1 (Bellocchio et al., 2000; Takamori et al., 2000), VGLUT2 (Freneau et al., 2000; Takamori et al., 2000) og VGLUT3 (Freneau et al., 2002; Gras et al., 2002; Takamori et al., 2002). Glutamatopptak mediert av de tre VGLUT er avhengig av både den elektriske og den kjemiske gradienten av H^+ (Freneau et al., 2002). Disse tre proteinene viser differensiert lokalisasjon under hjernens utvikling (Boulland et al., 2004) og er viktig for dannelsen av synaptiske vesikler (Freneau et al., 2004).

1.8 Glutamatmetabolisme

Glutamat som blir tatt opp av celler bidrar til forskjellige metabolske prosesser (proteinsyntese, energimetabolisme, amineringsreaksjoner), eller bli resirkulert og bli brukt som nevrotransmitter. I nerveterminaler er gjenbruken av glutamat som transmitter ganske enkelt å forstå, ettersom glutamat blir transportert inn i vesiklene av en vesikulær glutamattransportør (se ovenfor) for så å bli frigjort ved eksocytose. Glutamat som blir tatt opp av astrocyttene blir derimot omgjort til glutamin som deretter frigjøres til ekstracellulærvæsken for å bli tatt opp av nevronene (Chaudhry et al., 2002). Denne utvekslingen av glutamat og glutamin mellom astrocyttene og nevronene er foreslått å være den dominerende prosessen for resirkulering av glutamat som transmitter, og er kjent som glutamat-glutamin syklusen. Dette støttes av at glutamine syntetase er vist å være et gliacelleenzym ved immunhistokjemi (Martinez-Hernandez et al., 1977). Videre er en familie av glutamintransportører identifisert og vist å kunne transportere glutamin tilbake til nervecellen (Chaudhry et al., 1999; Chaudhry et al., 2002). Glutamin er normalt tilstede i ekstracellulærvæsken i mellom 200-500 μM (Gjessing et al., 1972; Hamberger et al., 1983; Hamberger og Nyström 1984). Glutamins tilstedeværelse hindrer ikke glutamaterg

transmisjon, og er i motsetning til glutamat ikke nevrotoksisk og aktiverer heller ikke glutamatreseptorene.



Glutamat-glutamin syklus. Dette er en av de viktigste reaksjonsveiene for å resirkulere transmitter-glutamat. Glutamat blir frigjort fra en nerveterminal ved eksocytose (ATP og Ca^{2+} -avhengig) og transporteres til cellene igjen ved hjelp av glutamattransportører lokalisert postsynaptisk (I), presynaptisk (VI) og i astroglia (II). Astroglia cellene detoksifiserer deretter glutamat ved å konvertere det til glutamin i en ATP-avhengig prosess. Glutamin blir så frigjort fra gliacellene via en glutamintransportør (III), og tas opp av nevroner av en annen glutamintransportør (IV). Glutamin blir nå konvertert tilbake til glutamat i nevronet, og kan bli pumpet inn i synaptiske vesikler v.h.a en vesikulær glutamattransportør (V). Figur: Danbolt, N.C, Progress in Neurobiology 2001.

Det er viktig å nevne at beskrivelsen av glutamin-glutamat syklus gitt ovenfor er en meget forenklet modell (Fonnum et al., 1993, Westgaard et al., 1995; Broman et al., 2000). Glutamat som transmitter er ikke *nødvendigvis* derivert fra glutamin, og glutamat må ikke *nødvendigvis* bli omgjort til glutamin når det blir tatt opp i astrocyttene. Glutamin er heller ikke *kun* en forløper til glutamat, men kan også bli brukt som energikilde for nevroner. Glutamat kan ha flere skjebner etter opptak i astrocyttene. Glutamat kan f.eks bli aminert til glutamin av ATP-avhengig glutamin syntetase (Martinez-Hernandez et al., 1977), eller bli omgjort til α -ketoglutarat som kan metaboliseres videre i sitronsyresyklus (TCA) (for oversikt, se Danbolt et al., 2001).

1.9 Regulering av glutamatopptak

Det har vært kjent i over 20 år at glutamatopptak ikke er konstant, men undergår regulering gjennom hele livet. En rekke studier har vist at glutamat reguleres på mange nivåer fra DNA-transkripsjon, mRNA-splicing, proteinsyntese og protein-targeting. Man har også sett at ablasjon av glutamterge fibre i sentralnervesystemet fører til redusert glutamatopptak i gliacellene. (Divac et al., 1977; Storm-Mathisen, 1977). Glutamattransportørene GLT og GLAST reguleres også av vannløselige stoffer, noe som er blitt vist ved forsøk med astrocytter i kultur med nevroner. Astrocytter i kultur med nevroner induserer ekspresjon av GLT og GLAST (Gegelashvili et al., 1997; Swanson et al., 1997; Schlag et al., 1998), mens astrocytter i fravær av nevroner uttrykte GLAST, men ikke GLT (Kondo et al., 1995; Gegelashvili et al., 1996). Det er fremdeles usikkert hvilke faktorer fra nevronene som stimulerer ekspresjon av transportørene.

Generelt vet man at translokering av membranproteiner fra plasmamembraner og til intracellulære rom representerer en viktig reguleringsmekanisme (Liu Y et al., 1999). Slike forandringer i celleoverflateekspresjon kan opp- og nedregulere membranproteiner i løpet av minutter, og er mye raskere enn det som er mulig ved proteinsyntese. Ekspresjonen av glutamattransportørene er kontrollert på lignende måte. Forsøk med C6 gliomceller som kun uttrykker EAAC (Palos et al., 1996; Dowd et al., 1996) har vist at glutamattransporten raskt øker ved aktivering med protein kinase C (Dowd og Robinson, 1996) p.g.a mobilisering av intracellulære lagre av EAAC (Davis et al., 1998). Man ser tilsvarende en reduksjon i transportaktivitet ved inhibisjon av fosfatidylinositol 3-kinase (Davis et al., 1998).

En rekke studier har vist, uten å kunne bestemme den nøyaktige virkningsmekanisme, at protein kinaser kan modulere transportaktiviteten til glutamat (Gonzales et al., 1999; Lortet et al., 1999). Disse proteinkinase-medierte effektene impliserer nødvendigvis ikke at kinasene fosforylerer selve transportproteinet, og det betyr nødvendigvis heller ikke at fosforyleringen endrer transportørenes kinetikk, ettersom proteinkinaser kan innvirke på transportaktiviteten på flere indirekte måter. Det er forøvrig vist at proteinkinase C direkte fosforylerer GLAST og reduserer transportaktiviteten med ca. 25% uten forandringer i celleoverflateekspresjon (Conradt og Stoffel, 1997). GLT var rapportert til å øke aktivitet ved proteinkinase C-mediert fosforylering (Casado et al., 1993), men en nyere studie (Tan et al., 1999) foreslår at dette er grunnet protein kinase C-mediert overflateekspresjon av endogent EAAC (Blakely et al., 1991). En annen studie med proteinkinase aktivering i MDCK-celler med stabil GLT-ekspresjon har faktisk vist at overflateekspresjon av GLT nedreguleres (Carrick og Dunlop, 1999). Med andre ord virker det som om effekten av fosforylering vil variere i forskjellige celler ettersom de har forskjellig intracellulær maskineri og vil føre til forskjellige effekter (Carrick og Dunlop, 1999).

2. Resultater

2.1 Affinitetsrensning av p83 sammen med GLT

Tidlig på 90-tallet ble det laget antistoffer mot GLT etter at GLT hadde blitt rensset fra rottehjerne. Ved screening av et rotte-cDNA bibliotek med dette antistoffet isolerte man to cDNA kloner. Den ene cDNA sekvensen kodet for GLT og den andre sekvensen antok man uttrykte et protein som var relatert til GLT, og fikk benevnelsen p83. Fullengde p83 har ikke blitt uttrykt, rensset og funksjonelt karakterisert. I senere tid har man funnet ut at glutamattransportører opptrer som homooligomerer (Haugeto et al., 1996; Dehnes et al., 1998; Eskandari et al., 2000) med opptil 2-3 subenheter og man har i tillegg funnet proteiner som interagerer med og modulerer transportegenskapene til EAAT4 (Jackson et al., 2001). Vi postulerte derfor at dette nye proteinet som ble rensset sammen med GLT kanskje er slikt interagerende protein som modulerer funksjonen til GLT, eller kanskje en del av proteinkomplekset til GLT.

2.2 Sekvensering av p83

Jeg fikk p83 sekvensert for å kartlegge den åpne leserammen og aminosyresekvensen. Dessuten ble informasjon fra sekvenseringen også brukt til å lage primere for PCR kloning av ekspresjonskonstrukter for å overprodusere p83.

Sekvenseringen resulterte i et DNA-fragment på 1101 basepar som tilsvarer ca. 367 aminosyrer som gir en teoretisk molekylvekt på 39.755 Da (40kDa). Sekvensen hadde både start og stopp-kodon og gir en aminosyresammensetningen som følger:

Aminosyresammensetning, p83:

Alanin	15 (4.56)	Isoleucine	11 (3.34)
Arginin	11 (3.34)	Leucine	24 (7.29)
Asparagin	11 (3.34)	Lysin	19 (5.78)
Aspartat	16 (4.86)	Methionin	8 (2.43)
Cystein	4 (1.22)	Prolin	22 (6.69)
Fenylalanin	11 (3.34)	Serin	51 (15.50)
Glutamat	36 (10.94)	Threonin	25 (7.60)
Glutamin	11 (3.34)	Tryptofan	0 (0.00)
Glysin	15 (4.56)	Tyrosin	7 (2.13)
Histidin	4 (1.22)	Valin	28 (8.51)

Molekylvekt: 39.755 daltons, 367 aminosyrer

Som vi ser består proteinet av både negative og positive ladede aminosyrer (36 enheter glutamat (-) og 16 enheter aspartat (-) mot 11 enheter arginin (+), 19 lysin (+) og 4 enheter histidine (+)). Ladede aminosyrer kan være viktige for binding av andre proteiner og for antistoffproduksjon.

2.3 Sekvensscreening i cDNA-database

En offentlig tilgjengelig nettbasert database (<http://www.paralign.org/>) ble brukt for analyser av sekvenshomologi på aminosyrenivå. Det ble funnet sekvenshomologi (42% identisk) med et cellemembranprotein, *Putative Endopeptidase LytE Precursor* (309 aminosyrer). Ifølge en annen offentlig tilgjengelig proteindatabase (<http://www.ebi.uniprot.org/>) er dette en cellevegg hydrolase i bakterien *Bacillus Subtilis* og deltar i autolyse. Ved eksponering av det metabolske toksinet natriumazid vil det føre til autolyse av cellemembranen (Smith et al., 2000). Det ble også funnet noe homologi (22% identisk) til et annet protein, *Cytadherence Accessory Protein 1* (1139 aminosyrer), i *Mycoplasma Genitalis*. Dette proteinet fungerer i den cytoskjelett lignende strukturen som stabiliserer formen av mycobakterien ved å forankre organellene i det veggløse Mycoplasma. Det fungerer med andre ord som et type forankringsprotein i *Mycoplasma Genitalis*. Det er dermed mulig at p83 også fungerer som et cellemembranprotein i likhet med sine homologer, hvor den interagerer med andre cellemembranproteiner..

2.4 Subkloningsreaksjoner

Vi ønsket å bruke deler av p83s peptidsekvens for bl.a immunisering av kaniner for antistoffproduksjon. Vi valgte å subklone p83s DNA inn i en passende vektor. Med kjent DNA-sekvens kunne vi nå kjøre PCR av p83. Ved hjelp av primere (PR2366 og PR2483, se figur 1) fikk vi oppkonsentrert den mellomliggende DNA-sekvensen på ca. 1100 bp.

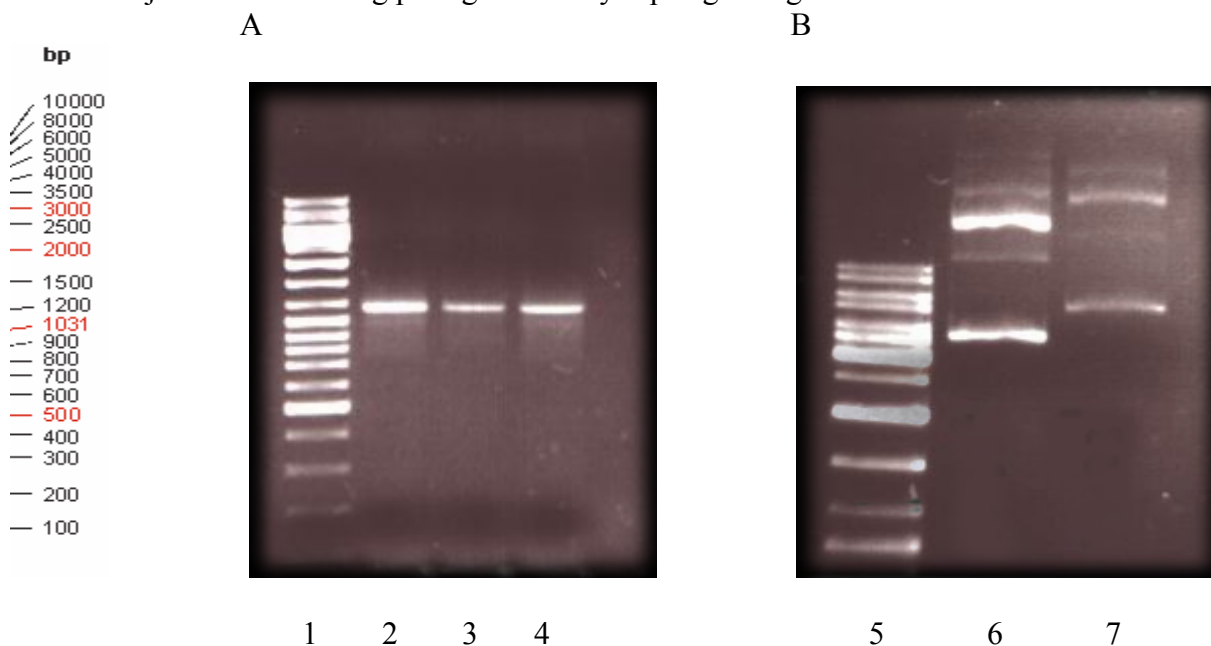


Figur 1: PCR av p83 med primere PR2366 og PR 2438.

PCR-produktet var nå klart til å subklones i en passende vektor. Vi brukte flere forskjellige vektorer, både med polyhedrin-promoter (pQE-vektorer) og med T7-promotor (pT7).

Vi ligerte inn p83 i vektorene pQE30 og pT7 etter at vi restriksjonskuttet vektor og p83 med restriksjonsendonukleasene *Bam*HI og *Hind*III. Ligeringsmiksen ble deretter transformert inn i transformasjonskompetente *E. coli* celler (ER2566) ved elektroporering (elektrosjokk). Vi hadde nå transformert plasmidkonstruktet vårt (pT7-p83 og pQE30-p83) inn i *E. coli*, og lot det vokse i SOC vekstmedium i 2 timer, og deretter ble det platet ut på LB-agarose vekstmedium med ampicillin, slik at vi kun fikk vekst av selekterte kolonier. Dagen etter ble kolonier plukket og satt på overnattskultur (ONK) i 25 ml LB-ampicillin- medium, slik at vi kunne få vekst av bakterien vår som produserte plasmidkonstruktet. Vi isolerte deretter plasmid-DNA fra bakteriene ved hjelp av et kommersielt kit, QIAGEN Mini Prep (se materialer og metoder).

For å bekrefte plasmid utbyttet ble DNAet analysert på agarosegel. I tillegg ble identiteten av insertene sjekket ved PCR og påfølgende analyse på agarosegel:



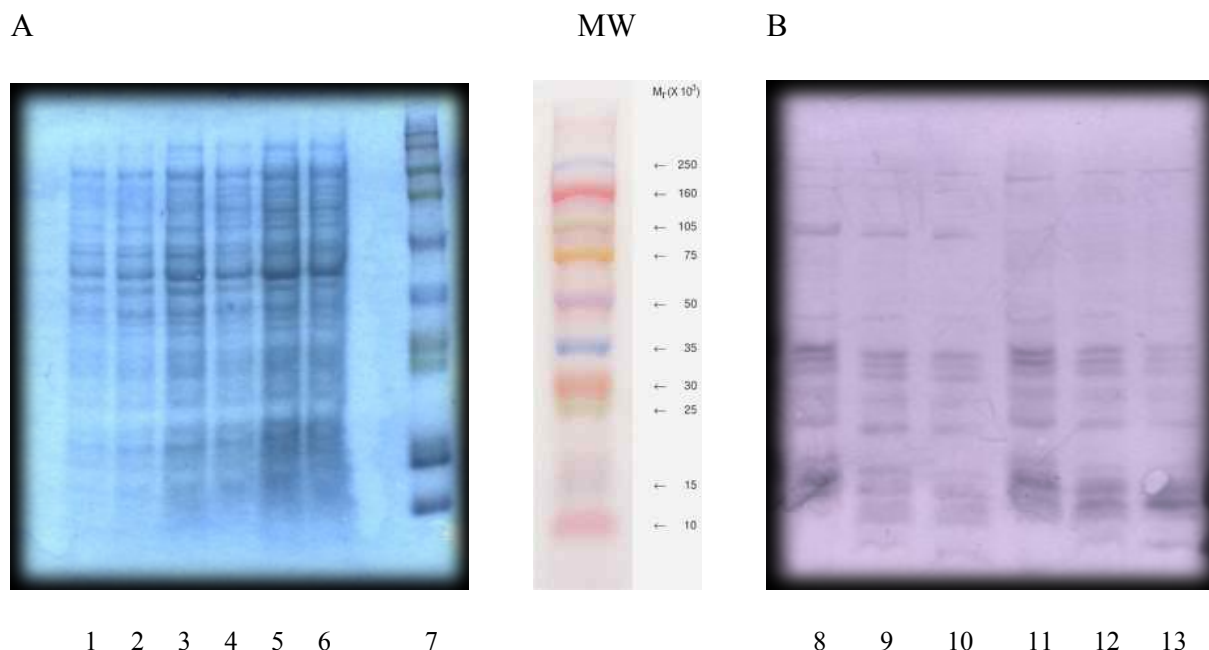
Figur 2: Analyse av PCR produkter (A) og plasmid miniprep (B) på 1% agarosegeler. 1: GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 2: p83¹, 3: p83², 4: p83³, 5: DNA ladder, 6: pT7-p83, 7: pQE30-p83.

PCR-produkteene (figur 2A, 1-3) kjørt med de samme primere som for subkloning viser et bånd på ca. 1100 basepar som forventet. På 1% agarosegel (2B) sees bånd på ca. 4600 bp med pQE30-p83 (7) og ca. 3900 bp med pT7-p83 (6). Dette tilsvarer summen av vektorene (pQE30: 3461 bp, pT7: 2887 bp) og p83-insert (1101 bp). Dette viser at subkloning var vellykket. De to ekstra båndene øverst i figur 2B er sannsynligvis grunnet multiple former av plasmid DNA.

2.5 Proteinekspresjonsanalyser

Vi hadde nå klart å lage to plasmidkonstrukturer og var klare til å se om vi kunne få uttrykt proteinene i bakterieceller. Vi brukte pT7-p83 og pQE30-p83 konstruktene til dette. Igjen transfekterte vi *E. coli*-celler (ER2566) ved elektroporering og lot transformantene vokse i SOC medium, og deretter i LB-ampicillin. Siden vi skulle gjøre en proteinekspresjonsanalyse brukte vi 500 ml LB-ampicillin medium og lot bakteriene formere seg i ca. 4 timer. Vi tok regelmessige OD₆₀₀ -målinger og induserte dernest veksten med IPTG (*Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside*) ved OD₆₀₀ ~ 1.0.

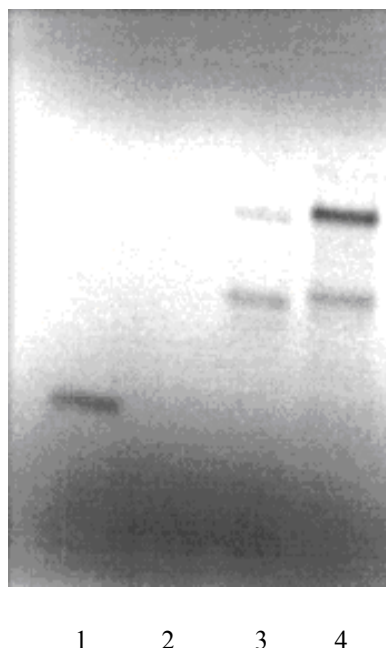
Deretter spant vi ned cellene og resuspenderte cellene i en sonikeringsbuffer og sonikerte cellene. Ved sonikering sender man høyfrekvent lyd igjennom celleduspensjonen og som fører til at cellemembranen til bakteriene brister og frigir proteinene. Vi analyserte proteinekstraktene våre på SDS-PAGE (polyakrylamidgeler). Vi kjørte to identiske geler (med pQE30 og pT7 konstruktene). Den ene gelen brukte vi til CBB-farging (Coomassie Brilliant Blue) for påvisning av proteiner generelt, mens den andre brukte vi til å kjøre et Western Blot. Primærantistoffet jeg brukte var det opprinnelige antistoffet mot hele det rensede GLT-molekylet (anti-73 kDa antistoff). Dette var det samme antistoffet som ble brukt da GLT og p83 ble identifisert ved den primære screeningen av cDNA biblioteket.



Figur 3: A: 12% Proteingel farget med Coomassie Brilliant Blue. B: Western Blot. 1: pT7 (-), 2: pQE30 (-), 3: pT7-p83 4 μ l, 4: pT7-p83 2 μ l, 5: pQE30-p83 4 μ l, 6: pQE-p83 2 μ l, 7: Full-Range Rainbow™ Molecular Weight Marker, 8: pT7 (-), 9: pQE30 (-), 10: pT7-p83 4 μ l, 11: pT7-p83 2 μ l, 12: pQE30-p83 4 μ l, 13: pQE-p83 2 μ l. Man ser ikke antydning til induisert eller uttrykt bånd rundt 40 kDa (mellom blått og lilla bånd) på noen av figurene slik vi skulle forvente ved induisert vekst.

Vi forventet å se induksjon av p83 og et bånd rundt 40 kDa ettersom dette er den teoretiske molekylvekten til p83. Som figuren viser tilsatte vi 2 og 4 μ l av ekspressjonsproduktene. Nr. 1, 2, 8 og 9 tilsvarer pT7 og pQE30 uten insert av p83, og vi ser, som ventet, ingen induksjon her. I nr. 3, 4, 10 og 11 har vi tilsatt 2 og 4 μ l ekstrakter fra celler transformert med p83 konstruktene uten at vi ser noen forskjell fra negativ kontroll (pT7 og pQE30 uten insert av p83). Nr. 5, 6, 12 og 13 er tilsatt 2 og 4 μ l pQE30-p83, også her uten tegn til vekst. Resultatet ble at vi verken så antydning til induisert vekst ved Coomassie-farging eller ved Western Blot. Vi gjentok forsøkene flere ganger med ulike induksjonsbetingelser men med likt resultat.

For å se om det i det hele tatt var mulig å få ekspressjon av proteinet brukte vi et kommersielt tilgjengelig invitro transkripsjons og translasjons-system, *TNT® Quick Coupled Transcription/ Translation System* fra *Promega*. I denne metoden brukes reticulocyttekstrakt fra kanin som merker in vitro translaterte proteiner med [35 S]-methionin. Dette kan deretter detekteres ved hjelp av en fosforimagermaskin. Metoden krever at det brukes plasmid med T7-promoter, ettersom kanin reticulocytter inneholder T7 RNA-polymerase. Vi brukte derfor pT7 konstruktet.



Figur 4: Merker etter autoradiografi på fosforimagerplate. 1: Positiv kontroll med Luciferase DNA + [^{35}S]-methionin, 2: Negativ kontroll med Luciferase DNA med ikke-merket methionin, 3: pT7-p83¹, 4: pT7-p83². Vi ser sterke bånd som antyder syntese av p83.

I nr. 1 har vi positiv kontroll for å se at radiomerkingen fungerer. Dette er et eget protein som følger med i kittet og skal sikre at produktet fungerer. I nr. 2 har vi negativ kontroll, uten tilsatt radiomerket methionin. Nr. 3 og 4 viser pT7-p83¹ og pT7-p83² som er to identiske konstrukter. Det er en innbyrdes konsentrasjonsforskjell, men vi ser at begge proteinene er uttrykt. Proteinmarkør er ikke vist i forsøket ettersom proteinmarkører er fargekodet og ikke radiomerket.

Selvom vi fikk ekspresjon av p83 i reticulocyttekstraktet fikk vi ikke rensset proteinet ettersom det ikke var realistisk å lage store mengder protein på denne måten. Vi hadde kun 50 μl reaksjoner i små Eppendorfrør og alt dette ble kjørt på SDS-PAGE. Ettersom arbeidet med å uttrykke proteinet hadde pågått over lengre tid uten å gi resultat, endte det opp med at vi fikk peptidet vårt syntetisert kommersielt etter å ha analysert p83-sekvensen med et dataprogram (Protean Lasergene) som kan se etter de mest hydrofile, og dermed de *antatt* mest antigene delene av en proteinsekvens.

3. Diskusjon/ konklusjon

En rekke glutamattransportører har interagerende proteiner (EAAT4). Det er grunn til å tro at p83 kan være et slikt interagerende protein spesielt for GLT, ettersom disse to ble identifisert under rotte- cDNA bibliotekscreening med antistoff mot GLT. Størrelsen på proteinfragmentet (~ 40 kDa) tilsier også at det kan være et interagerende protein til GLT. Søk i databaser viser også at p83s aminosyresekvens har homologi til to andre celleveggsproteiner, slik at p83 med stor sannsynlighet forekommer i cellemembranen og vil kunne interagere med GLT.

Jeg har forøvrig hatt problemer med å uttrykke proteinet, noe som kan ha flere årsaker. Det er flere faktorer som avgjør hvorvidt man får ekspresjon av et protein, f.eks hvilken ekspresjonsvektor som brukes, hvilken organisme man uttrykker proteinet i, og om vekst og induksjonsvilkårene er optimale. Det kan tenkes at proteinet ikke ble uttrykt siden E. coli-stammen jeg brukte manglet bestemte tRNA molekyler, eller at det var andre mangler i cellemaskineriet. Det kan også tenkes at proteinet som syntetiseres er toksisk for cellen og fører til celledød, eller at foldingen av proteinet ikke skjer på riktig måte. Men at p83 er et protein er tydelig demonstrert av et in vitro kanin retikulocyttekstrakt transkripsjon og translasjonssystem.

For å utlede p83s fysiologiske funksjon er det flere ulike eksperiment som må gjøres. Bl.a bør det lages spesifikke antistoffer mot p83, men som kun gjenkjenner p83, ikke GLT. Dette kan gjøres ved å kjøpe kommersielle peptider som man deretter kan immunisere kaniner med. Det kan deretter gjøres lokaliseringsstudier i hjernevev, og forsøke å co-lokalisere p83 med GLT og deretter trekke slutninger om deres relasjon. Videre bør GLT uttrykkes i forskjellige heterologe ekspresjonssystemer, f.eks mammalske celler og xenopus ocytter som også uttrykker p83. Dette bør så brukes til å karakterisere effekten p83 har på GLTs ekspresjon og funksjon. Sist men ikke minst kan man forsøke å inaktivesere genet ved hjelp av "knock out"-mus for å karakterisere fenotype.

GLT er viktig for å regulere glutamatkonsentrasjonen i sentralnervesystemet. Det er derfor veldig viktig å karakterisere p83 og forstå dens betydning for funksjonen av GLT spesielt, og cerebrale funksjoner generelt. Det er vist at mutasjoner i interagerende proteiner kan resultere i økt eller redusert funksjon av transportproteinene. Dette medfører i enkelte tilfeller til patologiske tilstander. P83 er derfor et potensielt protein for utvikling av sykdom, men også et potensielt target for fremtidig medikamentell behandling.

4. Materiale og utstyr

4.1 1% Agarosegeler

Alle agarose geler ble laget til 1% med *SeaKem* agarose ved å blande 0.5 g agarose med 50 ml 0.5X TBE. Blandingen ble varmet i mikrobølgeovn i ca. ett minutt til det kokte, deretter tilsatt 10 µl ethidiumbromid (EtBr) og overført til et minigelkar med 8 brønner for. Alle agarosegeler ble kjørt på 100-110V i 20-25 min og 10 µl av DNA størrelses markør fra *Fermentas* (*GeneRuler™ DNA Ladder Mix*) ble brukt til agarosegelene.

4.2 12% Polyakrylamidgeler (SDS-PAGE)

Alle polyakrylamidgeler ble laget med 30% polyakrylamid fra *Bio-Rad* ammoniumpersulfat og N,N,N,N-Tetra methylethylenediamine fra *Bio-Rad*.

Separasjonsgel: 4 ml 30% polyakrylamid ble blandet med 3.4 ml ddH₂O, 2.5 ml 3X gelbuffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8) og 100 µl 10% SDS. 50 µl 10 % ammoniumpersulfat og 10 µl TEMED ble tilsatt til slutt.

Stacking-gel: 1.3 ml 30% polyakrylamid ble blandet med 6.1 ml ddH₂O, 2.5 ml 3X gelbuffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8) og 100 µl 10% SDS. 50 µl 10 % ammoniumpersulfat og 10 µl TEMED ble tilsatt til slutt.

For å støpe og å kjøre gelene ble *Mini-PROTEAN® 3* systemet fra *Bio-Rad* brukt. 0.75 mm spacere (inkorporert i den ene glassplaten) kam med 15 brønner og glassplater (geldimensjon: 8.0 cm (bredde) x 7.3 cm (høyde)) ble brukt for å støpe geler. Alle polyakrylamidgeler ble kjørt med anodebuffer (0.2 M Tris, pH 8.9) og katodebuffer (0.1 M Tris, 0.1% SDS, pH 8.2) på 50V i 20 min., og deretter på 200V i 2 timer.

4.3 Dobbeltdestillert vann (ddH₂O)

Alt dobbeltdestillert (ddH₂O) vann ble tatt fra *Milli-Q* destilleringsmaskin fra *Millipore*.

4.4 Sekvensering

Sekvenseringen av p83 ble gjennomført ved hjelp av en automatisk sekvenseringsmaskin (*ABI PRISM 3700 DNA analyzer*) sammen med et kommersielt tilgjengelig kit (*Big Dye® Terminator Chemistry*).

Sekvenseringsmaskinen er kapillærelektroforese-basert, og *Big Dye® Terminator Chemistry* fungerer ved at fluoresserende fargestoffer inkorporeres i DNA etterhvert som sekvenseringsreaksjonen foregår. Inkorporeringen av dideoksynukletidtrifosfater (ddNTP, også kalt fargestoffterminatorer) hindrer videre forlengelse av DNA-tråden, som fører til avkortede lineære DNA-fragmenter merket med ett av de fire fargestoffene. De merkede DNA-produktene analyseres ved kapillær elektroforese som separerer DNA-fragmentene på grunnlag av størrelse. Til slutt blir sekvensen bestående av de fire DNA basene adenin(A), cytosin(C), guanin(G), og thymin(T) satt sammen.

Det ble brukt 1,5 ml Eppendorf-rør til prosedyren, og vi blandet 25-100 fmol templat, 1 μ l primer med konsentrasjon 3.2-3.5 pmol/ μ l, 4 μ l Big Dye®-reagens og deretter dobbelt destilert vann (ddH₂O) til et totalvolum på 20 μ l.

4.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Alle PCR-reaksjoner ble kjørt på PCR-maskin fra *MJ Research*, Modell nr. *PTC-2000*. Til hver PCR-reaksjon ble det brukt 2.5 μ l 10X PCR-buffer ((NH₂)₂SO₄ + 20mM MgCl₂) fra *Fermentas*, 0.5 μ l BioTAQ DNA Polymerase fra *Bioline*, 2 μ l 2.5 mM dNTP, 5 μ l av hver primer, DNA-templat (p83) og ddH₂O til et totalvolum av 25 μ l. Reaksjonene ble så overført til PCR-maskinen med følgende PCR-protokoll:

PCR-protokoll			
	Temp	Tid	Sykler
1.	93°C	1 min.	
2.	93°C	30 sekunder	25
3.	55°C	1 min.	25
4.	72°C	1 min	25
5.	4°C	∞	

4.6 Restriksjonskutting og ligeringsreaksjoner

Restriksjonskutting ble foretatt med 2 μ l NEB2 buffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂), 1 mM dithiothreitol, pH 7.9), 0.5 μ l av hver restriksjonsendonuklease (*Bam*H1, *Hind*III fra *New England Biolabs*), DNA-templat og ddH₂O til totalvolum av 20 μ l.

Ligeringer ble foretatt med DNA-templat og vektor etter restriksjonskutting. Dette ble blandet i riktig konsentrasjonsforhold (templat/vektor: 1:2) og deretter varmet opp ved 45 °C i 2 min, og deretter satt på is i 2 min. Det ble så tilsatt 1.2 μ l 10x ligeringsbuffer og 0.2 μ l DNA ligase fra *Roche*. Dette ble deretter varmet på blokk i 18-20 °C i én time.

4.7 Transformering ved elektroporering

Transformasjonen ble gjort med transformasjonskompetente *E.coli* celler (ER2566) og en elektroporator. Vi brukte 0.5-1.0 μ l templat (avhengig av konsentrasjon) som vi blandet med 50 μ l *E.coli* celler og overførte til en elektrosjokkkyvette. Transformasjonen ble gjennomført ved å utsette cellene for et elektrosjokk i ca. 8.5-10 ms ved resistans = 400 Ω , kapasitans = 21 mF og spenning = 2000V. Etter elektrosjokk ble cellene tilsatt 500 μ l SOC-vekstmedium og inkubert ved 37°C i 1-2 timer og deretter platet ut på LB-ampicillin medium og videre inkubert ved 37 °C over natt.

4.8 Isolering av plasmid-DNA fra *E.coli* (mini preparering)

Prinsippet for plasmid isolering er at man lyserer cellemembranen slik at plasmid-DNA lekker ut, og deretter sentrifugerer man bakterierestene slik at man sitter igjen med plasmid-DNA i supernatanten. Til slutt feller man DNA med etanol.

Utstyr

Overnattskultur

P1-buffer m/ 10µg/ml RNase: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0

P2-buffer: 0.2 M NaOH, 1% SDS

P3-buffer: 2.55 M KAc pH 4.8

RNase-buffer: 10 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA, 300 mM NaCl (sterilfiltrert)

Isopropanol

70% etanol

10 mg/ml RNase (kokt i 10 min. i RNase-buffer)

Overnattskulren ble overført til Eppendorf-rør (~1.5 ml) og sentrifugert på bordsentrifuge i 6000 rpm i 2 min. ved romtemperatur. Supernatanten ble helt av. Pelletten ble resuspendert ved 300 µl P1-buffer tilsatt 10 µg/ml RNase, og videre tilsatt 300 µl P2-buffer og blandet forsiktig ved å vende røret opp ned 4-5 ganger umiddelbart etter tilsetning. Dette ble så stående ved romtemperatur i 5 min. P2-bufferen virker ved å permeabilisere cellemembranen slik at plasmidet siver ut mens kromosomalt DNA blir værende inne i cellen. 300 µl P3-buffer ble tilsatt lysatet og blandet forsiktig ved å snu røret opp ned 4-5 ganger. Dette ble så satt på is i 15 min. og deretter sentrifugert ved 14.000 rpm i 30 min. ved 4 °C. 700 µl av supernatanten ble pipetert over i ett nytt eppendorfrør og tilsatt 560 µl (0.8x volum) isopropanol med romtemperatur. Dette ble blandet godt og sentrifugert ved 14.000 rpm i 30 min. ved romtemperatur. Supernatanten ble helt av igjen og røret ble tilsatt 300 µl 70% etanol og sentrifugert ved 13.000 rpm i 2-5 min. ved romtemperatur og gjentatt en gang til. Supernatanten ble helt av en siste gang og satt på frysetørk i 9 min. og resuspendert i 20 µl ddH₂O. Plasmid-DNA var nå isolert.

4.9 Analyse av proteinekspresjon

Ekspresjonsanalysene ble foretatt i *e.coli* (ER2566). Kolonier ble selektert og tilsatt i 10 ml LB-ampicillin medium til vekst over natt (ONK). Dette ble så helt over i 0.5 liter LB-ampicillin medium for videre vekst. Vi målte OD₆₀₀ med et UV/synlig lysspektrofotometer, *Shimadzu UV-1601 UV-VIS*, for å bestemme cellekonsentrasjonen. Proteinekspresjon ble induisert ved tilsatt av IPTG (3mM for pQE-vektor, 1mM for pT7 vektor) ved OD₆₀₀ ~ 0.8-1.0). Cellen ble indusert i 2 timer før de ble sentrifugert ved 5.000 rpm i 4 min (0.5 l sentrifugekopper i *Beckman sentrifuge, JA-10 rotor*) ved romtemperatur. Cellene ble deretter resuspendert i 20 ml ddH₂O og overført til 40 ml Sorvall-rør og resentrifugert ved 6.000 rpm i 4 min. Cellene ble nå resuspendert i 5 ml sonikeringsbuffer (50mM TrisHCl, 500mM NaCl, 1mM EDTA, β-mercaptoetanol/DTT) pr gram cellepellet og sonikert i 3 x 20 sek ved 60W og satt på is mellom hver sonikering. Cellelysate ble så sentrifugert ved 13.000 rpm i 15 min ved 4 °C og supernatanten ble analysert på proteingel. Proteingelen ble farget ved bruk av Coomassie fargeløsning (45% methanol, 5% eddiksyre, 0.1% *Coomassie Blue*) og avfarget med avfargingsløsning (45% methanol, 5 % ethanol).

Gelen ble først farget med 50 ml Coomassiefargeløsning i én time og avfarget med 50 ml avfargingsløsning i minst 30 min. Gelen ble deretter vakumtørket ved 80 °C i 1 time.

4.11 Western Blotting

Utstyr

Bio-Rad Transblot® *SD semi-dry transfer*, nitrocellulosemembran fra *Millipore*, filterpapir (6 stk), methanol, transferbuffer (49 mM Tris, 39 mM glycine, 0,005-0,02 % SDS, 10% methanol, pH 9.2), vaskebuffer (PBS + 0.05% Tween20), 3% BSA (PBS + 3% BSA), vaskebuffer (100 mM Tris pH 7,5, 0,9% NaCl) primærantistoff (PBS + 1:5.000 mus antistoff), sekundærantistoff (PBS + 1:2.000 geit anti-mus antistoff) og substrat BCIP/NBT (5 mM MgCl₂, 16,5 µl BCIP, 33 µl NTB, 0,1M Tris pH 9,5).

Nitrocellulosemembranen ble først inkubert i methanol i 5 sekunder. Deretter ble membranen og filterpapirene overført til transferbuffer sammen med den ferdigkjørte gelen og inkubert i 20 min. Gelen, filterpapirene og membranen var nå klare for selve blottet, og dette ble gjort med *Bio-Rad Transblot*® *SD semi-dry transfer*. Dette apparatet ligger horisontalt, og på anoden legges først tre lag med filterpapir, deretter membranen, så gelen og øverst ligger de 3 siste filterpapirene. Vi har nå fått en blot-sandwich og presser ut luft-bobler ved å rulle en glasspipette på oversiden av det siste filterpapiret. Katoden settes på tilslutt og apparatet kobles til en spenningskilde. Spenningen ble satt til 20V i 35 min. Membranen ble nå vasket med PBS + 0.05% Tween20 i 2 min og deretter blokkert med PBS + 3% BSA over natt. Membranen ble så vasket med PBS + 0.05% Tween20 i 2x 5 min og deretter inkubert med 10 ml primærantistoff i ca. to timer. Membranen ble deretter vasket med PBS + 0.05% Tween20 i 3x15 min. og så inkubert med 10 ml av sekundærantistoffet i én time. Membranen ble igjen vasket med PBS + 0.05% Tween20 i 3x15 min., og deretter vasket med en ny buffer (100 mM Tris pH 7,5, 0,9% NaCl) i 15 min. Substrat BCIP/NBP ble nå tilsatt og lagt på ristepate. Etter at båndene ble klare på membranen ble den vasket med 50mM Tris, pH 7.5 og lagt til tørk.

4.12 TNT® Quick Coupled Transcription/ Translation System

Utstyr:

TNT® Quick Master Mix, [³⁵S]-methionin (1,000 Ci/mmol at 10 mCi/ml), plasmid DNA templat (0.5µg/µl), Luciferase Control DNA (0.5µg/µl), 1 mM methionin, ddH₂O.

40 µl TNT® Quick Master Mix pipetteres ut i et eppendorfrør og tilsettes 2 µl [³⁵S]-methionin og 2 µl plasmid-DNA templat og tilslutt ddH₂O til et totalvolum av 50 µl. Som positiv kontroll brukes Luciferase Control DNA sammen med radiomerket [³⁵S]-methionin og som negativ kontroll brukes Luciferase Control DNA med vanlig ikke-radiomerket methionin. Ettersom TNT® Quick Master Mix ikke inneholder aminosyren methionin vil opptak av radiomerket methionin i proteinene gi utslag ved autoradiografi merker på fosforimagerplate.

Referanser

1. Aihara, Y., Mashima, H., Onda, H., Hisano, S., Kasuya, H., Hori, T., Yamada, S., Tomura, H., Yamada, Y., Inoue, I., Kojima, I., Takeda, J., 2000. Molecular cloning of a novel brain-type Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J. Neurochem.* 74, 2622-2625
2. Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1997. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4155-4160.
3. Attwell, D., Laughlin, S.B., 2000. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain, *J Physiol.* 525, 61P.
4. Attwell, D., Sarantis, M., Szatkowski, M., Barbour, B., Brew, H., 1991. Patch clamp studies of electrogenic glutamate uptake; ionic dependence modulation and failure in anocia. In: Wheal, H., Thomson, A. (Eds.), *Excitatory Amino Acids and Synaptic Transmission*. Academic Press, New York, pp. 223-237.
5. Balcar, V. J., Johnston G.A.R., 1972. The structural specificity of the high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate by rat brain slices. *J. Neurochem.* 19, 2657-2666.
6. Bar-Peled, O., Ben-Hur, H., Biegón, A., Groner, Y., Dewhurst, S., Furuta, A., Rothstein, J.D., 1997. Distribution of glutamate transporter subtypes during human brain development. *J. Neurochem.* 69, 2571-2580.
7. Barbour, B., Brew, H., Attwell, D., 1998. Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *Nature* 335, 433-435.
8. Blakely, R.D., Clark, J.A., Rudnick, G., Amara, S.G., 1991. Vaccinia-T7 RNA polymerase expression system: evaluation for the expression cloning of plasma membrane transporters. *Anal. Biochem.* 194, 302-308.
9. Berger, U.V., Hediger, M.A., 1998. Comparative analysis of glutamate transporter expression in rat brain using differential double in situ hybridization. *Anat. Embryol.* 198, 13-30.
10. Broman, J., Hassel, B., Rinvik, E., Ottersen, O.P., 2000. Biochemistry and anatomy of transmitter glutamate. In: Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J., (Eds.), *Glutamate*. Elsevier, Amsterdam, pp. 1-44.
11. Carrick, T., Dunlop, J., 1999. Protein kinase C modulation of the human excitatory amino acid transporter 2 subtype of glutamate transporter. *Soc. Neurosci. Abstr.* 25 (1), 426.
12. Casado, M., Bendahan, A., Zafra, F., Danbolt, N.C., Aragón, C., Gimenez, C., Kanner, B.I., 1993. Phosphorylation and modulation of brain glutamate transporters by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 268, 27313-27317.
13. Chaudhry, F.A., Lehre, K.P., Campagne, M.V., Ottersen, O.P., Danbolt, N.C., Storm-Mathisen, J., 1995. Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* 15, 711-720.
14. Conradt, M., Stoffel, W., 1997. Inhibition of the high-affinity brain glutamate transporter GLAST-1 via direct phosphorylation. *K. Neurochem.* 68, 1244-1251.
15. Conti, F., DeBiasi, S., Minelli, A., Rothstein, J.D., Melon, M., 1998. EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and GABAergic neurons besides pyramidal cell in the rat cerebral cortex. *Cereb. Cortex* 8, 108-116.
16. Danbolt, N.C., 1994. The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. *Prog. Neurobiol.* 44, 377-396.
17. Danbolt, N.C., Storm-Mathisen, J., Kanner, B.I., 1992. A [Na⁺+K⁺] coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience* 51, 295-310.
18. Danbolt, N.C., Chaudhry, F.A., Dehnes, Y., Lehre, K.P., Levy, L.M., Ullensvang, K., Storm-Mathisen, J., 1998. Properties and localization of glutamate transporters. *Prog. Brain. Res.* 116, 23-43.
19. Davis, K.E., Straff, D.J., Weinstein, E.A., Bannerman, P.G., Correale, D.M., Rothstein, J.D., Robinson, M.B., 1998. Multiple signaling pathways regulate cell surface expression and activity of the excitatory amino acid carrier 1 subtype of Glu transporter in C6 glioma.

20. Dehnes, Y., Chaudhry, F.A., Ullensvang, K., Lehre, K.P., Storm-Mathisen, J., Danbolt, N.C., 1998. The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells; a glutamate gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *J. Neurosci.* 18, 3606-3619.
21. Disbrow, J.K., Gershten, M.J., Ruth, J.A., 1982. Uptake of L-[³H] glutamic acid by crude and purified synaptic vesicles from rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108, 1221-1227.
22. Divac, I., Fonnum, F., Storm-Mathisen, J., 1977. High affinity uptake of glutamate in terminals of corticostriatal axons. *Nature* 266, 377-378.
23. Dowd, L.A., Robinson, M.B., 1996. Rapid stimulation of EAAC1-mediated Na⁺-mediated L-glutamate transport activity in C6 glioma cells by phorbol ester. *J. Neurochem.* 67, 508-516.
24. Dowd, L.A., Coyle, A.J., Rothstein, J.D., Pritchett, D.B., Robinson, M.B., 1996. Comparison of Na⁺-dependent glutamate transport activity in synaptosomes, C6 glioma and *Xenopus oocytes* expressing excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1). *Mol. Pharmacol.* 49, 465-473.
25. Eskandari, S., Kreman, M., Kavanaugh, M.P., Wright, E.M., Zampighi, G.A., 2000. Pentameric assembly of neuronal glutamate transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8641, 8646.
26. Fairman, W.A., Vandenberg, R.J., Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1995. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375, 599-603.
27. Fifkova, E. 1985. A possible mechanism of morphometric changes in dendritic spines induced by stimulation. *Cell. Mol. Neurobiol.* 5, 47-63.
28. Fischer, M., Kaeck, S., Knutti, D., Matus, A., 1998, Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20, 847-854.
29. Fonnum, F., 1993. Regulation of the synthesis of the transmitter glutamate pool. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 60, 47-57.
30. Furuta, A., Martin, L.J., Lin, C.L.G., Dykes-Hoberg, M., Rothstein, J.D., 1997. Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporter 3 and 4. *Neuroscience* 81, 1031-1042.
31. Fykse, E.M., Iversen, E.G., Fonnum, F., 1992. Inhibition of L-glutamate uptake into synaptic vesicles. *Neurosci. Lett.* 135, 125-128.
32. Gegalashvili, G., Civenni, G., Racagni, G., Danbolt, N.C., Schousboe I., Schousboe, A., 1996. Glutamate receptor agonist up-regulate glutamate transporter GLAST in astrocytes. *Neuroreport* 8, 261-265.
33. Gjessing, L.R., Gjesdal, P., Sjaastad, O., 1972. The free amino acids in human cerebrospinal fluid. *J. Neurochem.* 19, 1807-1808.
34. Gonzalez, M.I., Lopez-Colome, A.M., Ortega, A., 1999. Sodium-dependent glutamate transport in Müller glial cells: regulation by phorbol esters. *Brain Res.* 831, 140-145.
35. Grunewald, M., Bendahan, A., Kanner, B.I., 1998. Biotinylation of single cysteine mutants of the glutamate transporter GLT-1 from rat brain reveals its unusual topology. *Neuron* 21, 623-632.
36. Hamberger, A., Berthold C.H., Karlsson B., Lehmann, A., Nystöm B., 1983. Extracellular GABA, glutamate and glutamine in vivo-perfusion-dialysis of rabbit hippocampus. *Neurol. Neurobiol.* 7, 473-492.
37. Hamberger, A., Nyström B., 1984. Extra and intracellular amino acids in the hippocampus during development of hepatic encephalopathy. *Neurochem. Res.* 9, 1181-1192.
38. Haugeto, Ø., Ullensvang, K., Levy, L.M., Chaudhry, F.A., Honoré, T., Nielsen, N., Lehre, K.P., Danbolt, N.C., 1996. Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J. Biol. Chem.* 271, 27715-27722.
39. Hollmann, M., Henemann, S., 1994. Cloned glutamate receptors, *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 31-108.
40. Inage, Y.W., Itoh, M., Wada, K., Takashima, S., 1998. Expression of two glutamate transporters, GLAST and EAAT4, in the human cerebellum: their correlation in development and neonatal hypoxic ischemic damage. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 554-562.
41. Itoh, M., Watanabe, Y., Watanabe, M., Tanaka, K., Wasd, K., Takashima, S., 1997. Expression of a glutamate transporter subtype, EAAT4 in the developing human cerebellum. *Brain Res.* 767, 265-271.

42. Jackson, M., Song, W., Liu, M.Y., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., Lin, C.I., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Sternweis, P.C., Rothstein, J.D., 2001. Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAT4 by two interacting proteins. *Nature* 410, 89-93.
43. Kanai, Y., Hediger, M.A., 1992. Primary structure and functional characterization of a high -affinity glutamate transporter. *Nature* 360, 467-471.
44. Kanner, B.I., Sharon, I., 1978. Active transport of L-glutamate by membrane vesicles isolated from rat brain. *FEBS. Lett.* 94- 245-248.
45. Kondo, K., Hashimoto, H., Kitanaka, J., Sawada, M., Suzumura, A., Marunouchi, T., Baba, A., 1995. Expression of glutamate transporters in cultured glial cells. *Neurosci. Lett.* 188, 140-142.
46. Korkotian, E., Segal, M., 1999. Bidirectional regulation of dendritic spine dimensions by glutamate receptors. *Neuroreport* 10, 2875-2877.
47. Kramer, R., Heberger, C., 1986. Functional reconstitution of carrier protein by removal of detergent with a hydrophobic ion exchange column. *Biochem. Biophys. Acta* 863, 289-296.
48. Kramer, R., Palmieri, F., 1989. Molecular aspects of isolated and reconstituted carrier proteins from animal mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta* 974, 1-23.
49. Kugler, P., Schmitt, A., 1999. Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system. *Glia* 27, 129-142.
50. Lehmann, A., Isacson, H., Hamberger A., 1983. Effects of in vivo administration of kainic acid on the extracellular amino acid pool in the rabbit hippocampus. *J. Neurochem.* 40, 1314-1320.
51. Lehre, K.P., Levy, L.M., Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J., Danbolt, N.C., 1995. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J. Neurosci.* 15, 1835-1853.
52. Lehre, K.P., Danbolt, N.C., 1998. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J. Neurosci.* 18, 8751-8757.
53. Levy, L.M., Warr, O., Attwell, D., 1998. Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na⁺-dependent glutamate uptake. *J. Neurosci.* 18, 9620-9628.
54. Liu, Y., Krantz, D.e., Waites, C., Edwards, R.H., 1999. Membrane trafficking of neurotransmitter transporters in the regulation of synaptic transmission. *Trends Cell. Bio.* 9, 356-363.
55. Lortet, S., Samuel, D., Had-Aissouni, L., Masméjean, F., Kekerian-Le Goff, K., Pisano, P., 1999. Effects of PKA and PKC modulators on high affinity glutamate uptake in primary neuronal cell cultures from rat cerebral cortex. *Neuropharmacology* 38, 395-402.
56. Martinez-Hernandez, A., Bell, K.P., Norenberg, M.D., 1977. Glutamine synthetase glial localization in brain. *Science* 195, 1356-1358.
57. Minn, A., Gayet T., 1977. Kinetic study of glutamate transport in rat brain mitochondria. *J. Neurochem.* 29, 873-881.
58. Nagao, S., Kwak, S., Kanazawa, I., 1997. EAAT4 a glutamate transporter with properties of a chloride channel, is predominantly localized in Purkinje cell dendrites, and forms parasagittal compartments in rat cerebellum. *Neuroscience* 78, 929-933.
59. Naito, S., Ueda, T., 1983. Adenosine triphosphate-dependent uptake of glutamate into protein I-associated synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* 258, 696-699.
60. Ottersen, O.P., Zhang, N., Walberg, F., 1992. Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. *Neuroscience* 46, 519-534.
61. Özkan, E.D., Ueda, T., 1998. Glutamate transport and storage in synaptic vesicles. *Jpn. J. Pharmacol.* 77, 1-10.

62. Palos, T.P., Ramachandran, B., Boado, R., Howard, B.D., 1996. Rat C6 and human astrocytic tumor cells express a neuronal type of glutamate transporter. *Mol. Brain Res.* 37, 297-303.
63. Pines, G., Danbolt, N.C., Bjørås, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E., Kanner, B.I., 1992. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*, 360, 464-467.
64. Roskoski, R., Jr, 1979. Net uptake of aspartate by high-affinity rat cortical synaptosomal transport system. *Brain Res.* 160, 85-93.
65. Rusakov, D.A., Harrison, E., Stewart, M.G., 1998. Extrasynaptic glutamate diffusion in the hippocampus; ultrastructural constraints, uptake, and receptor activation. *K. NERisci.* 19, 3158-3170.
66. Rusakov, D.A., Kullmann, D.M., Stewart, M.G., 1999. Hippocampal synapses; do they talk to their neighbours? *Trends Neurosci.* 22, 382-388.
67. Schmitt, A., Asan, E., Püschel, B., Kugler, P., 1997. Cellular and regional distribution of the glutamate transporter GLAST in the CNS of rats: non-radioactive *in situ* hybridization and comparative immunocytochemistry. *J. Neurosci.* 17, 1-10.
68. Seal, R.P., Amara, S.G., 1998. A reentrant loop domain in the glutamate carrier EAAT1 participates in substrate binding and translocation. *Neuron* 21, 1487-1498.
69. Slotboom, D.J., Lolkema, J.S., Konings W.N., 1996. Membrane topology of the C-terminal half of the neuronal glial and bacterial glutamate transporter family. *J. Biol. Chem.* 271, 31317-31321.
70. Storm-Mathisen, J., 1977. Glutamic acid and excitatory nerve endings; reduction of glutamic acid uptake after axotomy. *Brain Res.* 120, 379-386.
71. Storck, T., Schulte, S., Hoffmann, K., Stoffel, W., 1992. Structure, expression, and functional analysis of a Na⁺ - dependent glutamate/ aspartate transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 10955-10959.
72. Szatkowski, M., Barbour, B., Attwell, D., 1991. The potassium-dependence of excitatory amino acid transport – resolution of a paradox. *Brain Res.* 555, 343-345.
73. Takamori, S., Rhee, J.S., Rosenmund, C., Jahn, R., 2000. Identification of a vesicular glutamate transporter that defies a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* 407, 189-194.
74. Tan, J., Zeleniaia, O., Correale, D., Rothstein, J.D., Robinson, M.B., 1999. Expression of the GLT1 subtype of Na⁺-dependent glutamate transporter: pharmacological characterization and lack of regulation by protein kinase C. *J. Exp. Pharmacol. Ther.* 289, 1600-1610.
75. Tanaka, K., 1993. Expression cloning of a rat glutamate transporter. *Neurosci. Res.* 16, 149-153.
76. Tanaka, J., Ichikawa, R., Watanabe, M., Tanaka, K., Inoue, Y., 1997. Extra-junctional localization of glutamate transporter EAAT4 at excitatory Purkinje cell synapses. *Neuroreport* 8, 2461-2464.
77. Ventura, R., Harris, K.M., 1999. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J. Neurosci.* 19, 6897-6906.
78. Wahle, S., Stoffel, W., 1996. Membrane topology of the high-affinity L-glutamate transporter (GLAST-1) of the central nervous system. *J. Cell. Bio.* 135, 1867-1877.
79. Wenzel, J., Lammert, G. Meyer, U., Krug, M., 1991. The influence of long-term potentiation on the spatial relationship between astrocyte processes and potentiated synapses in the dentate gyrus neuropil of rat brain. *Brain Res.* 560, 122-131.
80. Westergaard, N., Sonnewald, U., Schousboe, A., 1995. Metabolic trafficking between neurons and astrocytes: the glutamate glutamine cycle revisited. *Dev. Neurosci.* 17, 203-211.
81. Yamada, K., Watanabe, M., Shibata, T., Tanaka, K., Wada, K., Inoue, Y., 1996. EAAT4 is a post-synaptic glutamate transporter at Purkinje cell synapses. *Neuroreport* 7, 2013-2017.
82. Zerangue, N., Kavanaugh, M.P., 1996. Interaction of L-cysteine with a human glutamate transporter. *Nature* 383, 634-637.